

DOI: 10.5846/stxb201306211754

班剑娇, 冯佳, 王志强, 谢树莲. 理化因子对谷皮菱形藻细胞密度及中性脂含量的影响. 生态学报, 2015, 35(10): 3349-3356.

Ban J J, Feng J, Wang Z Q, Xie S L. Effects of physical and chemical factors on the growth and neutral lipid content of *Nitzschia palea*. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(10): 3349-3356.

理化因子对谷皮菱形藻细胞密度及中性脂含量的影响

班剑娇, 冯 佳, 王志强, 谢树莲*

山西大学生命科学学院, 太原 030006

摘要:以高脂微藻谷皮菱形藻(*Nitzschia palea* NY025)为实验材料,探讨了利用光密度法和尼罗红荧光染色法测定细胞生长和细胞中性脂含量的可行性,进而研究了温度、光强及培养基中 N、P、Si 含量对藻细胞生长和中性脂积累的影响。结果表明:(1)谷皮菱形藻在 675nm 处存在最大吸收峰,细胞密度与 OD₆₇₅之间存在良好的线性关系,利用光密度法和尼罗红荧光染色法表征谷皮菱形藻生物量和中性脂含量操作简单,适用于高通量样品的测定;(2)谷皮菱形藻在 20℃,光强 160 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 时生长最快,在 20℃,光强 200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 时,有利于中性脂积累;(3)培养基中 N、P、Si 浓度分别为 80、120、100 mg/L 时,有利于谷皮菱形藻细胞生长,其中, N 元素影响最大,其次是 P、Si,且 N、P、Si 三因子以及交互作用 N×P 与 P×Si 对藻株生长作用均为显著。培养基中 N、P、Si 浓度分别为 80、120、50 mg/L 时,利于中性脂积累,其中, N 元素影响最大,其次是 Si、P,且因子 N、Si 及交互作用 N×P、N×Si 作用均为显著;(4)可采用两步培养法,先使谷皮菱形藻细胞大量增殖,而后适当改变培养条件,以增加脂质合成。

关键词:谷皮菱形藻; 理化因子; 细胞密度; 中性脂

Effects of physical and chemical factors on the growth and neutral lipid content of *Nitzschia palea*

BAN Jianjiao, FENG Jia, WANG Zhiqiang, XIE Shulian*

School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: An algal strain, *Nitzschia palea* NY025, was chosen as experimental materials for its high-lipid content. The feasibility of optical density method used for cell growth determination was investigated first. Then Nile red fluorescence was used for determining the relative neutral lipid contents because neutral lipid content was a key standard of choosing algae in biodiesel production. Furthermore, the effects of temperature, light intensity, nitrogen, phosphorus and silicon on the cell growth and neutral lipid contents of *N. palea* were investigated. The results showed that: (1) The maximum absorption of *N. palea* existed at 675nm, and the absorption showed a good linear relationship with cell density. Therefore, the growth of *N. palea* could be obtained by measuring OD₆₇₅. Optical density method and Nile red fluorescence possessed advantage of simple operation, so they were suitable for high-throughput sample analysis. (2) The optimum temperature was 20℃ for increasing the cell density and neutral lipid content of *N. palea*. The finest light intensity for the growth of *N. palea* was 160 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, while the best light intensity for neutral lipid accumulation was 200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. It is suggested that increasing light intensity appropriately might increase neutral lipid contents in algal cells. (3) Under the optimum temperature and light intensity, the orthogonal experiments of nitrogen, phosphorus and silicon were designed to research into their effects on the growth and neutral lipid contents of *N. palea*. The influence of nitrogen on the growth of *N. palea* was the most significant, then the factor phosphorus and the last one was factor silicon. The growth of *N. palea* was influenced significantly by factors nitrogen, phosphorus, silicon and interaction factors nitrogen with phosphorus, nitrogen

收稿日期: 2013-06-21; 网络出版日期: 2014-05-30

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: xiesl@sxu.edu.cn

with silicon. The optimum growth rate was obtained when the content of nitrogen, phosphorus and silicon were 80 mg/L, 120 mg/L and 100 mg/L, respectively. The influence of factor nitrogen on neutral lipid accumulation was the most significant, next was factor silicon and the last one was factor phosphorus. Neutral lipids accumulation was influenced significantly by factors nitrogen, silicon and interaction factors nitrogen with phosphorus, nitrogen with silicon. The maximum neutral lipid accumulation was obtained when the concentration of nitrogen, phosphorus and silicon were 80 mg/L, 120 mg/L and 50 mg/L, respectively. (4) In conclusion, the lipid synthesis can be improved by two-step method. First the cell density of *N. Palea* was increased, and after gathering plenty of cells the culture conditions changed to increase neutral lipid contents.

Key Words: *Nitzschia palea*; physical and chemical factors; cells density; neutral lipid

随着人类社会不断发展,对能源的需求量越来越大,已导致石油等化石能源紧缺,能源危机问题突显。寻求洁净的可再生能源成为目前的一个重要研究领域。生物柴油作为石油的替代品具有巨大的应用潜力,已引起了广泛关注^[1-3]。

利用微藻资源生产生物柴油具有多方面的优点,如光合效率高,生长速度快,培养周期短,不需要占用大量耕地,而且细胞结构简单,通过生物技术手段易于改造,油脂组成符合生物柴油生产的要求等。因此,微藻也被认为是最有潜力的生物柴油生产原料^[4]。

目前,关于微藻的选育已有一些报道^[5-7]。谷皮菱形藻(*Nitzschia palea*)隶属于硅藻门(Bacillariophyta),菱形藻科(Nitzschiaceae),广泛分布于江河湖海等各种水体中,为广盐性藻种^[8],是一种在水产养殖方面极具经济价值的种类^[9]。作者在前期研究中已发现该种具有生长速度快、油脂产率高的特点,是一种较理想的高脂藻种^[10]。

硅藻内部的理化成分与其生长的环境相关^[11-12],温度、光强、pH、培养基成分等的改变都会影响细胞内部脂质含量与组成。利用各种培养条件的优化,可以实现藻细胞内部油脂含量的提升。本文以作者前期筛选的一株高脂谷皮菱形藻为研究对象,进行了温度、光强和培养基中N源、P源、Si源的用量对该藻生长量及中性脂积累量的逐级优化,以期开发微藻生物柴油种质资源提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料及培养

谷皮菱形藻(*Nitzschia palea* NY025),分离自山西省汾河上游,为作者前期筛选到的具产油潜力藻株。将实验材料接种至D1培养基进行扩大培养,至对数期时进行后续实验。正交实验中,通过在D1培养基中添加相应量的N源、P源、Si源对该藻株进行优化培养。

1.2 实验方法

1.2.1 OD值与细胞密度线性关系的确立

开启紫外可见分光光度计进行联机操作。取谷皮菱形藻藻液,以D1培养基为对照,进行最大吸收峰的波长扫描,得到最大吸收波长为675nm。选取同一时期不同浓度的藻液,使用血球计数板计数,测定不同浓度藻液OD₆₇₅值,以OD₆₇₅为纵坐标,细胞浓度为横坐标,生成相关性曲线,并建立细胞密度与OD₆₇₅之间的回归方程。

1.2.2 培养温度的选择

设置5个温度梯度,即15,18,20,22,25℃,考察不同温度对谷皮菱形藻生长及中性脂积累的影响。取生长至对数期的藻液,接种至含D1培养基的20 mL试管中,初始接种OD₆₇₅ = 0.07±0.01,置于不同温度的微电脑光照培养箱(SPX-250B-G型,上海博讯)中静置培养,光强为120 μmol m⁻² s⁻¹,光暗比12h:12h,每日摇动数次。每个测定设3个重复。

生长量测定方法:自接种日起,取 240 μ L 藻液加入透明的 96 孔酶标板中,使用酶标仪检测藻液在 OD₆₇₅ 处的吸光值;中性脂含量测定方法^[13-14]:取 240 μ L 藻液加入黑色 96 孔酶标板中,加入 1 μ L 尼罗红染液,混匀后 37℃ 黑暗孵育 10min,使用酶标仪检测 598nm 激发光,543nm 散发光处的荧光强度,扣除未接藻的培养基染色后的荧光强度。绘制谷皮菱形藻生长及中性脂积累变化曲线,并通过比较相对吸光值及荧光值增长量得到最佳培养温度。之后在该温度下,进行下一步光照强度的优化。

$$\text{相对吸光值增长量} = (\text{OD}_{675\ 8} - \text{OD}_{675\ 1}) / 7$$

式中,OD_{675 8} 为培养第 8 天时藻液吸光值,OD_{675 1} 为接种时藻液吸光值。

$$\text{荧光值增长量} = (L_8 - L_1) / 7$$

式中, L_8 为培养第 8 天时藻液荧光值, L_1 为接种时藻液荧光值。

1.2.3 光照强度的选择

设置 3 个光强梯度,120、160、200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$,考察不同光强对谷皮菱形藻生长及中性脂积累的影响。取一定量的藻液,接种至含 D1 培养基的 20 mL 试管中,初始接种 OD₆₇₅ = 0.125 $\pm$ 0.01,置于不同光强的培养箱中培养,温度为 20℃,每个测定设 3 个重复。生长量与中性脂含量变化测定方法同 1.2.2。选用中性脂积累量最大时的光强,进行下一步实验。

1.2.4 N、P、Si 三因素正交实验

N 源、P 源、Si 源分别选用 NaNO₃、K₂ HPO₄ 与 KH₂PO₄、Na₂SiO₃ · 9H₂O。根据文献^[12-13]并基于 D1 培养基配方,设计 N、P、Si 三因素三水平正交实验(表 1)。实验选用 L₂₇(3¹³) 正交设计表(表 2)。配制 27 组添加不同含量 N、P、Si 的培养液。取对数期的藻液,离心并用各组培养基清洗两次,再将离心收集的材料分别接种

表 1 正交实验因子的水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment			
因素 Factors	N/ (mg/L)	P/ (mg/L)	Si/ (mg/L)
1	120	120	100
2	80	80	75
3	40	40	50

于对应的培养基中,每组设 3 个平行。置于光照培养箱中培养,光强为 200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$,温度为 20℃。

表 2 正交实验结果

Table 2 The results of orthogonal experiment

	1 N	2 P	3 N×P	4 N×P	5 Si	6 N×Si	7 N×Si	8 P×Si	9	10	11 P×Si	12	13	生长量 Growth	中性脂产量 Neutral-lipid content
1	①	①	①	①	①	①	①	①	①	①	①	①	①	0.116	61.538
2	①	①	①	①	②	②	②	②	②	②	②	②	②	0.086	85.186
3	①	①	①	①	③	③	③	③	③	③	③	③	③	0.061	64.131
4	①	②	②	②	①	①	①	②	②	②	③	③	③	0.100	47.790
5	①	②	②	②	②	②	②	③	③	③	①	①	①	0.102	53.844
6	①	②	②	②	③	③	③	①	①	①	②	②	②	0.094	119.277
7	①	③	③	③	①	①	①	③	③	③	②	②	②	0.091	72.052
8	①	③	③	③	②	②	②	①	①	①	③	③	③	0.015	17.190
9	①	③	③	③	③	③	③	②	②	②	①	①	①	0.051	24.735
10	②	①	②	③	①	②	③	①	②	③	①	②	③	0.146	84.425
11	②	①	②	③	②	③	①	②	③	①	②	③	①	0.100	87.950
12	②	①	②	③	③	①	②	③	①	②	③	①	②	0.075	134.370
13	②	②	③	①	①	②	③	②	③	①	③	①	②	0.103	51.335
14	②	②	③	①	②	③	①	③	①	②	①	②	③	0.113	173.74
15	②	②	③	①	③	①	②	①	②	③	②	③	①	0.093	261.252
16	②	③	①	②	①	②	③	③	①	②	②	③	①	0.137	62.473
17	②	③	①	②	②	③	①	①	②	③	③	①	②	0.127	139.771

续表

	1 N	2 P	3 N×P	4 N×P	5 Si	6 N×Si	7 N×Si	8 P×Si	9	10	11 P×Si	12	13	生长量 Growth	中性脂产量 Neutral-lipid content
18	②	③	①	②	③	①	②	②	③	①	①	②	③	0.111	135.556
19	③	①	③	②	①	③	②	①	③	②	①	③	②	0.163	69.395
20	③	①	③	②	②	①	③	②	①	③	②	①	③	0.128	113.843
21	③	①	③	②	③	②	①	③	②	①	③	②	①	0.079	79.15
22	③	②	①	③	①	③	②	②	①	③	③	②	①	-0.001	-15.125
23	③	②	①	③	②	①	③	③	②	①	①	③	②	-0.003	18.821
24	③	②	①	③	③	②	①	①	③	②	②	①	③	-0.002	-1.238
25	③	③	③	①	①	③	②	③	②	①	②	①	③	-0.003	3.025
26	③	③	③	①	②	①	③	①	③	②	③	②	①	-0.008	9.711
27	③	③	③	①	③	②	①	②	①	③	①	③	②	-0.005	13.220
T_1	0.080	0.106	0.070	0.062	0.095	0.078	0.080	0.083			0.088			Σ2.069	Σ1967.416
T_2	0.112	0.067	0.067	0.116	0.073	0.073	0.071	0.075			0.080				
T_3	0.039	0.057	0.093	0.052	0.062	0.078	0.079	0.072			0.061				
t_1	60.633	86.667	61.233	80.344	48.544	94.989	74.889	84.589			70.589				
t_2	125.656	78.856	61.511	91.233	77.789	49.511	82.744	60.489			89.311				
t_3	32.311	53.078	95.856	47.022	92.278	74.100	60.978	73.511			58.700				
R_T	0.073	0.049	0.026	0.063	0.033	0.005	0.009	0.010			0.027				
R_i	93.344	33.589	34.622	44.211	43.733	45.478	21.767	24.100			30.611				

R: 极差; T: 生长量均值; t: 中性脂产量均值

测定藻株在不同培养条件下的吸光值与荧光值增长量,绘制相应曲线。吸光值增长量 = (OD_{675 10} - OD_{675 1}), OD_{675 10} 为培养第 10 天时藻液吸光值, OD_{675 1} 为接种时藻液吸光值, 荧光值增长量 = (L₁₀ - L₁), L₈ 为培养第 10 天时藻液荧光值, L₁ 为接种时藻液荧光值。参照相关文献^[15] 对结果进行方差分析, 得出谷皮菱形藻生长及中性脂积累的最优 N、P、Si 水平组合。

2 研究结果

2.1 OD 值与细胞密度的线性关系

谷皮菱形藻藻液的波长扫描显示(图 1), 在 675nm 处存在最大吸收峰。且在 60s 内, 谷皮菱形藻沉降不明显(图 2), 短时间内不影响吸光值的测定。谷皮菱形藻的细胞密度与光密度 OD₆₇₅ 之间, 存在良好的线性关系(图 3), 相应的回归方程为 OD₆₇₅ = 0.10179C - 0.00247, 线性相关系数为 R₂ = 0.99782。因此可通过测定 OD₆₇₅ 来间接表示细胞密度, 进而表征藻株生长状况。

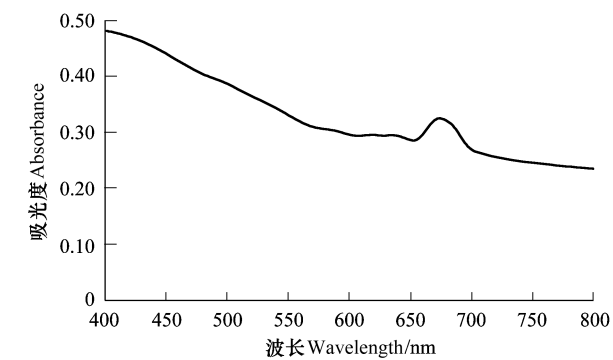


图 1 谷皮菱形藻的光谱扫描图
Fig.1 Spectrum of *Nitzschia pale*

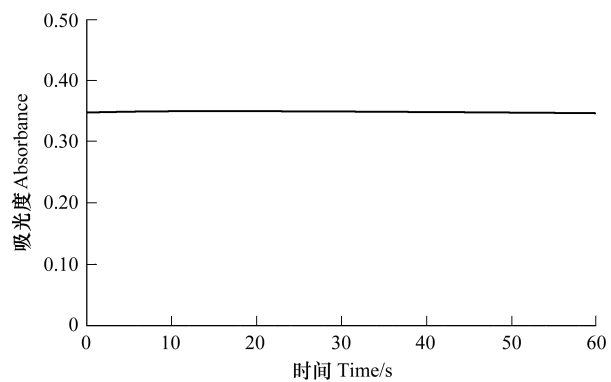


图 2 OD₆₇₅ 随时间的变化曲线
Fig.2 Absorbance curves change with time

2.2 不同温度下谷皮菱形藻生长量及中性脂含量

图 4 显示了不同温度下,谷皮菱形藻的生长情况。可以看出谷皮菱形藻在各个温度条件下均能生长,但生长速度有一定差异。5 个温度梯度下的吸光值增长量,可以看出藻株的生长量先上升后下降,在 20℃ 时达到最大。

图 4 显示了不同温度下,谷皮菱形藻的荧光值变化情况。可以看出荧光值含量变化不大。5 个温度梯度下的荧光值增长量,结果显示,藻株中性脂含量先升高后下降,在 20℃ 下中性脂产量最大。

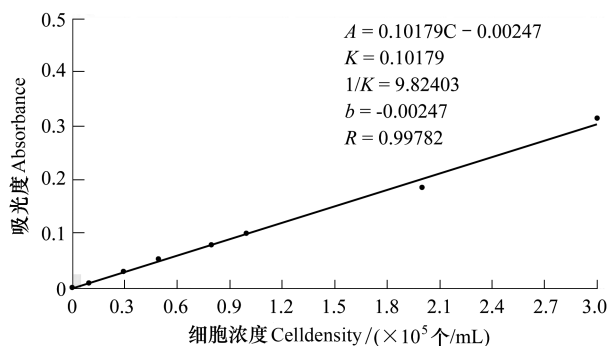


图 3 吸光度与细胞密度的标准曲线

Fig.3 Standard curve of absorbance with cell density

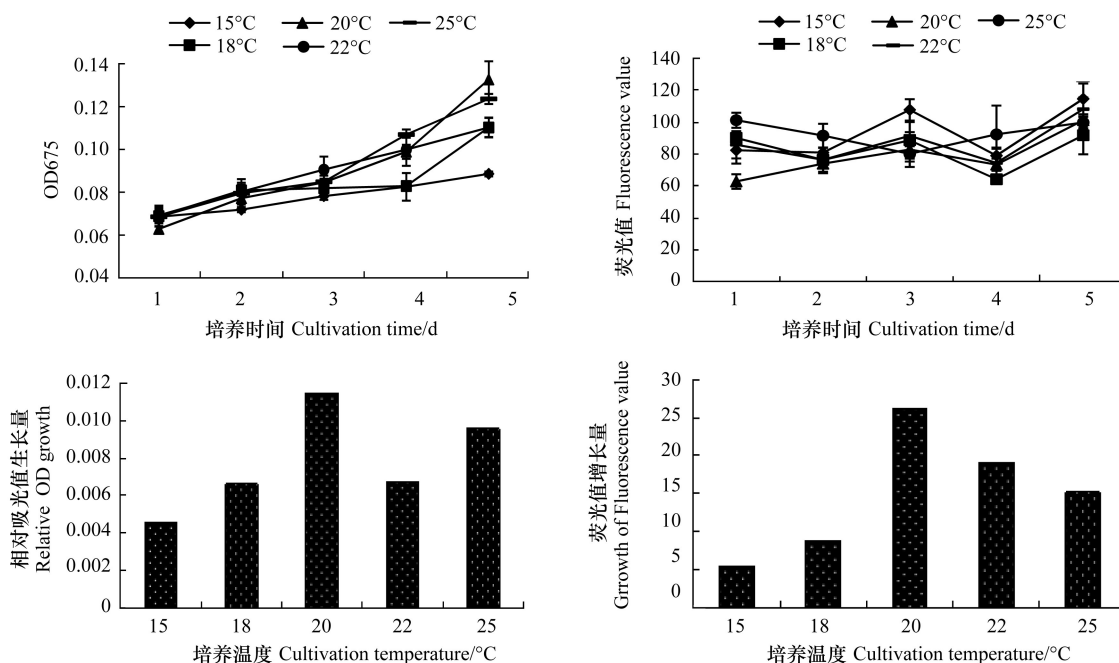


图 4 温度对谷皮菱形藻生长及中性脂含量的影响

Fig.4 Effects of temperature on growth and neutral lipid content of *Nitzschia palea*

2.3 不同光照强度下谷皮菱形藻生长量及中性脂含量

图 5 显示了在 120、160、200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 光强下,谷皮菱形藻的生长情况。可以看出谷皮菱形藻在不同光强下的生长趋势相似,生长速度差异不大。3 个光强梯度下的吸光值增长量,可以看出藻株在 160 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 时生长量达到最大。

图 5 显示了不同光强下,谷皮菱形藻的荧光值变化情况。可以看出荧光值含量随着时间的延长而增加。3 个光强梯度下的荧光值增加量,结果显示,在 200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 时中性脂产量最大。

2.4 培养基 N、P、Si 正交实验结果

由正交实验结果(表 2)可以看出,对于藻株吸光值增长量来说,极差 $R_N > R_P > R_{Si}$,即 N 含量对藻株生长影响最大,其次为 P,最后是 Si,对于 T 值来说, $N_2P_1Si_1$ 最大,因此最佳组合为 $N_2P_1Si_1$,即 N、P、Si 浓度分别为 80、120、100 mg/L 时,谷皮菱形藻生长量最大。而对于藻株荧光值增长量来说,极差值 $R_N > R_{Si} > R_P$,即 N 对中性脂积累影响最大, Si 次之, P 影响最小,根据 t 值可知, $N_2P_1Si_3$ 最大,因此最佳组合为 $N_2P_1Si_3$,即当培养基中 N、P、Si 浓度分别为 80、120、50 mg/L 时,谷皮菱形藻的中性脂积累最多。

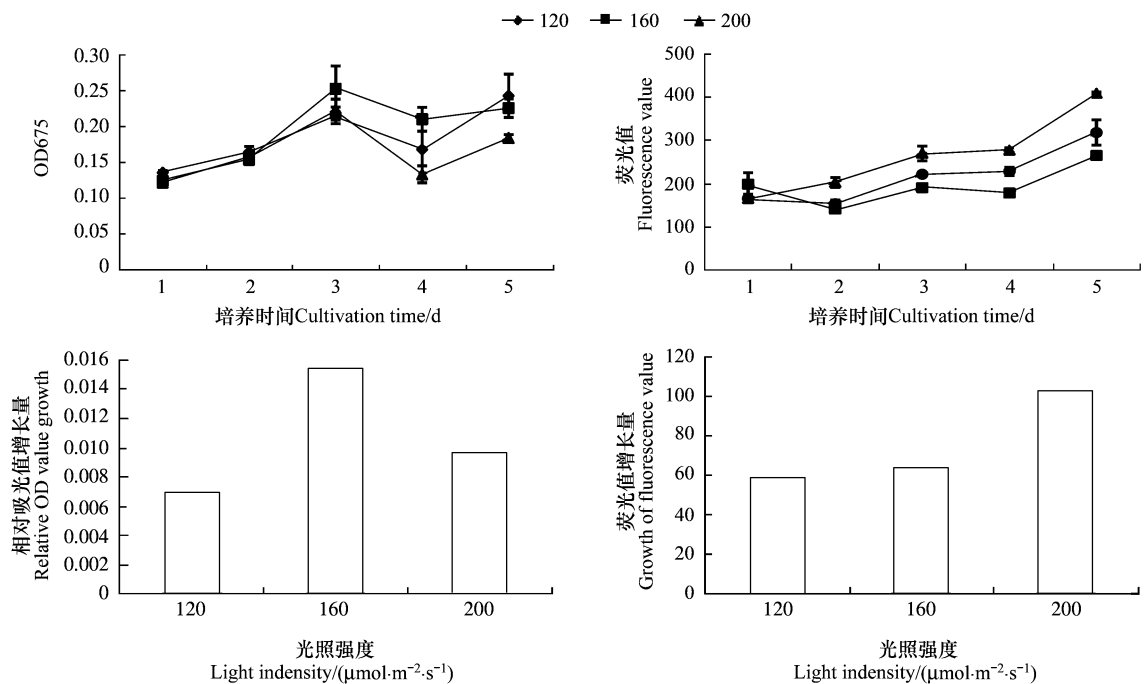


图 5 光照强度对谷皮菱形藻生长及中性脂含量的影响
Fig.5 Effects of light intensity on growth and neutral lipid content of *Nitzschia palea*

根据正交实验结果,进行了方差分析,N、P、Si 对谷皮菱形藻生长影响的方差分析如表 3 所示。由结果可知, F_N 、 F_P 、 F_{Si} 、 $F_{N \times P}$ 、 $F_{P \times Si}$ 均大于 F_α ,因此 N、P、Si 三因子以及交互作用下 N×P 与 P×Si 作用均为显著,因子 N×Si 作用不显著。各因素的最优水平为 $N_2P_1Si_1$,此时谷皮菱形藻生长量达到最大。表 4 中的结果显示了 N、P、Si 对谷皮菱形藻中性脂产量影响的方差分析, F_N 、 F_{Si} 、 $F_{N \times P}$ 、 $F_{N \times Si}$ 均大于 F_α ,因此因子 N、Si 及交互作用下 N×P、N×Si 的作用均为显著,因子 P 与 P×Si 作用不显著, $N_2P_1Si_3$ 的均值最大,为最有利于中性脂积累的水平组合。

表 3 正交实验对谷皮菱形藻生长影响的方差分析

Table 3 ANOVA of orthogonal experiment for effects of N, P, Si on the growth of <i>Nitzschia palea</i>					
变差来源 Sources	变差平方和 Sum of squares	自由度 df	均方差 Mean square	F	显著性 Significance
N	0.240960	2	0.012048	58.664839	*
P	0.012028	2	0.006014	29.283816	*
Si	0.004981	2	0.002491	12.127845	*
N×P	0.245868	4	0.006147	29.929803	*
N×Si	0.000537	4	0.00013	0.654281473	
P×Si	0.003993	4	0.00100	4.861309	*
误差 Deviation	0.001643	8	0.00021		
总和 Total	0.510013	26			

* 表示影响显著

3 讨论

谷皮菱形藻最大吸收峰的波长为 675nm,藻液细胞密度不同,其色素含量也不同,因而吸光值也有差异^[16]。由研究结果可知,细胞密度与光密度 OD₆₇₅之间,存在良好的线性关系,因此利用光密度法代替细胞计数来表征谷皮菱形藻生物量是可行的,且该方法操作步骤简单,数据准确,有利于高通量样品的计数。本文使

用尼罗红荧光染色法来间接表示细胞中性脂的含量,无需对样品进行干燥、破碎,操作简单,尤其适用于高通量样品的测定,需要注意的是操作应在较暗环境下进行,以防荧光淬灭。

表 4 N、P、Si 对谷皮菱形藻中性脂产量影响的方差分析

Table 4 ANOVA of orthogonal experiment for effects of N, P, Si on neutral lipid accumulation of *Nitzschia palea*

变差来源 Sources	变差平方和 Sum of squares	自由度 df	均方差 Mean square	F	显著性 Significance
N	41225.35282	2	20612.67641	22.93498285	*
P	5559.425059	2	2779.712529	3.092886043	
Si	8930.73186	2	4465.36593	4.968451887	*
N×P	16686.11851	4	4171.529627	4.641510813	*
N×Si	11517.68442	4	2879.421105	3.203828185	*
P×Si	6904.427822	4	1726.106956	1.920577058	
误差 Deviation	7189.951368	8	898.743921		
总和 Total	98013.69186	26			

* 表示影响显著

培养温度的变化对藻细胞生长与脂质积累都有较大的影响。本文研究结果显示在温度为 20℃ 时,最有利于谷皮菱形藻生长量与中性脂的积累,这与陈书秀等^[17]的研究结果是一致的。Renaud^[18]也报道过,在 20℃ 时最适于小新月菱形藻 *Nitzschia closterium* 与铲状菱形藻 *N. paleacea* 的生长与脂质积累,这是由于温度过高或过低都将影响藻细胞内各种酶的活性,温度最适时,酶活性最高,此时细胞生长与脂质积累达到平衡。最佳生长和脂质积累温度是 20℃,也提示我们,在进行谷皮菱形藻大量培养时,不仅可以采用密闭式光反应器培养,也有可能在合适的季节进行室外开放式跑道池培养,以降低成本。

本文的研究结果显示,在光强为 160 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 时最有利于谷皮菱形藻的生长,而中性脂积累的最佳光强要高于此值。早在 1974 年 Orcutt 就发现,高光强能促进 *Nitzschia closterium* 细胞内甘油三酯的合成^[19],其他学者也有类似报道^[20-21],可见适当增加光强可以有效促进中性脂的积累。有报道指出微藻中性脂大量积累一般发生于稳定期^[22],即晚于细胞增殖最快的对数期,这也提示人们在实际应用中可以采用两步培养法,先在光强 160 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 下培养,以使细胞大量增殖,而后再增加光强培养,以使中性脂得到大量合成。

正交实验的分析结果显示,对于藻细胞生长,N 元素影响最大,其次是 P、Si,且 N、P、Si 三因子以及交互作用 N×P 与 P×Si 对藻株生长作用均为显著,因此在藻株培养过程中,三因子都应该重点考虑。N、P、Si 浓度分别为 80、120、100 mg/L 时,生长最好。对于中性脂积累,N 影响最大,其次是 Si、P,且因子 N、Si 及交互作用 N×P、N×Si 作用均为显著,因此基于中性脂积累的藻株培养中,N、Si 应优先考虑。N、P、Si 的含量分别为 80、120、50 mg/L 时,最利于藻细胞中性脂积累。N 缺乏与 Si 缺乏在一定程度上可以增大中性脂的积累,可能是因为氮素的缺乏导致蛋白质合成的减少,从而使代谢途径朝脂肪和碳水化合物方向发展,而 Si 的缺乏被认为是促使某种合成脂质的酶活性增强,导致脂质含量增加^[23]。这也再次提示我们,在采用两步培养时,可以先以细胞增殖为目的,而后再降低 Si 浓度,以增加脂质合成。

4 结论

(1) 谷皮菱形藻在 675 nm 时,细胞密度与光密度 OD_{675} 之间,存在良好的线性关系,利用光密度法表征谷皮菱形藻生物量步骤简单,数据准确,有利于高通量样品的计数。采用尼罗红荧光染色法间接表示细胞中性脂的含量,无需对样品进行干燥、破碎,操作简单,适用于高通量样品的测定。

(2) 谷皮菱形藻在 20℃,光强 160 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 时生长最快,在 20℃,光强 200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 时,最有利于脂质积累。

(3) 培养基中 N、P、Si 浓度分别为 80、120、100 mg/L 时,有利于谷皮菱形藻细胞生长,其中,N 元素影响最

大,其次是 P、Si,且 N、P、Si 三因子以及交互作用 N×P 与 P×Si 对藻株生长作用均为显著。培养基中 N、P、Si 浓度分别为 80、120、50 mg/L 时,利于中性脂积累,其中,N 元素影响最大,其次是 Si、P,且因子 N、Si 及交互作用 N×P、N×Si 作用均为显著。

(4)可采用两步培养法,先使谷皮菱形藻细胞大量增殖,而后适当改变培养条件,以增加脂质合成。

参考文献 (References):

- [1] Wijffels R H, Barbosa M J. An outlook on microalgal biofuels. *Science*, 2010, 329(5993): 796-799.
- [2] Schenk P M, Thomas-Hall S R, Stephens E, Marx U C, Mussgnug J H, Posten C, Kruse O, Hankamer B. Second generation biofuels; high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy Research*, 2008, 1(1): 20-43.
- [3] 李涛, 李爱芬, 桑敏, 吴洪, 尹顺吉, 张成武. 富油能源微藻的筛选及产油性能评价. *中国生物工程杂志*, 2011, 31(4): 98-105.
- [4] Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 2007, 25(3): 294-306.
- [5] Rodolfi L, Chini G Z, Bassi N, Padovani G, Biondi N, Bonini G, Tredici M R. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 102(1): 100-112.
- [6] Miao X L, Wu Q Y. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology*, 2006, 97(6): 841-846.
- [7] 许瑾, 张成武, 李爱芬, 桑敏, 吴洪, 刘敏胜, 朱振旗. 华南地区淡水产油微藻藻株的分离与筛选. *可再生资源*, 2011, 29(1): 67-71.
- [8] 刘梅, 张宪孔. 谷皮菱形藻的耐盐适应性. *水生生物学报*, 1992, 16(2): 153-158.
- [9] 吴国平. 不同氮磷和光照水平对小球藻(*Chlorella vulgaris*)和谷皮菱形藻(*Nitzschia palea*)生长的影响 [D]. 重庆: 西南大学, 2006.
- [10] 班剑娇, 冯佳, 谢树莲. 山西地区高脂微藻的分离筛选. *植物科学学报*, 2013, 31(4): 415-421.
- [11] 张桂艳, 温小斌, 梁芳, 欧阳峥嵘, 耿亚红, 梅洪, 李夜光. 重要理化因子对小球藻生长和油脂产量的影响. *生态学报*, 2011, 31(8): 2076-2085.
- [12] 丁彦聪, 高群, 刘家尧, 衣艳君, 刘建国, 林伟. 环境因子对小球藻生长的影响及高产油培养条件的优化. *生态学报*, 2011, 31(18): 5307-5315.
- [13] 王金娜, 严小军, 周成旭, 徐继林. 产油微藻的筛选及中性脂动态积累过程的检测. *生物物理学报*, 2010, 26(6): 472-480.
- [14] Chen W, Zhang C W, Song L R, Sommerfeld M, Hu Q. A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *Journal of Microbiological Methods*, 2009, 77(1): 41-47.
- [15] 陆元鸿. 数理统计方法. 上海: 华东理工大学出版社, 2005: 162-172.
- [16] 沈萍萍, 王朝晖, 齐雨藻, 谢隆处, 王艳. 光密度法测定微藻生物量. *暨南大学学报*, 2001, 22(3): 115-119.
- [17] 陈书秀, 崔翠菊, 王虎, 曹增梅, 李霞, 孙娟. 温度对谷皮菱形藻生长及其理化成分的影响. *生物技术进展*, 2012, 2(1): 48-51.
- [18] Renaud S M, Zhou H C, Parry D L, Thinh L V, Woo, K C. Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochrysis* sp., *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea*, and commercial species *Isochrysis* sp. (clone T.ISO). *Journal of Applied Phycology*, 1995, 7(6): 595-602.
- [19] Orcutt D M, Patterson G W. Effect of light intensity upon lipid composition of *Nitzschia closterium* (*Cylindrotheca fusiformis*). *Lipids*, 1974, 9(12): 1000-1003.
- [20] Opote F I. Lipid and fatty-acid composition of diatoms. *Journal of Experimental Botany*, 1974, 25(4): 823-835.
- [21] 郭兵, 龚阳敏, 万霞, 梁焯, 江木兰. 光强和温度对球等鞭金藻(*Isochrysis sphaerica*)生长及其脂肪酸的影响. *中国油料作物学报*, 2011, 33(3): 295-301.
- [22] Zhu C J, Lee Y K, Chao T M. Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1. *Journal of Applied Phycology*, 1997, 9(5): 451-457.
- [23] Chaffin J D, Mishra S, Kuhaneck R M, Heckathorn S A, Bridgeman T B. Environmental controls on growth and lipid content for the freshwater diatom, *Fragilaria capucina*: a candidate for biofuel production. *Journal of Applied Phycology*, 2012, 24(5): 1045-1051.